

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 avril 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/28374 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A61K 9/51,
B01J 13/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03028

(22) Date de dépôt international : 1 octobre 2001 (01.10.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/12836 6 octobre 2000 (06.10.2000) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33 Avenue du
Docteur Georges Lévy, F-69693 VENISSIEUX (FR).

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : BRYSON,
Nathan [FR/FR]; 120 rue du Coteau, F-69390 MILLERY
(FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 84 rue d'Amsterdam, F-75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(54) Title: COLLOIDAL SUSPENSION OF SUBMICRONIC PARTICLES FOR CARRYING HYDROPHILIC ACTIVE PRINCIPLES (INSULIN) AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre: SUSPENSION COLLOIDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS HYDROPHILES (INSULINE) ET LEUR MODE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns a suspension of particles for carrying hydrophilic active principles (insulin). Said carrier particles are based on a polyethylene glycol/hydrophobic neutral polyaminoacid double-block polymer. Said polyethylene glycol/hydrophobic neutral polyaminoacid particles are associated with a hydrophilic active principle (insulin). The invention also concerns, a powdery solid from which the transporting particles are derived and the preparation of said solid and said suspension of transporting particles based on polyethylene glycol/hydrophobic neutral polyaminoacid particles and insulin. Said preparation consists in copolymerising N-carboxy-anhydrides of hydrophobic neutral polyaminoacid particles, in the presence of N-methylpyrrolidone, methanol, and amine-functionalised polyethylene glycol, thereby obtaining polyethylene glycol/hydrophobic neutral polyaminoacids, associating the latter with insulin; precipitating with water so as to obtain the carrier particles; optionally carrying out neutralisation, dialysis, concentration and elimination of water, thereby producing a powdery solid or suspended carrier particles and preparing pharmaceutical specialties.

(57) Abrégé : L'invention concerne une suspension de particules de vectorisation (PV) de principes actifs (PA) hydrophiles (insuline). Ces PV sont à base d'un copolymère dibloc PolyÉthylèneGlycol/polyaminoacides neutres hydrophobes polyAANO. Ces particules de PEG/polyAANO sont associées à un PA hydrophile (insuline). L'invention vise, également, un solide pulvérulent à partir duquel sont issues les PV ainsi que la préparation de ce solide et de cette suspension de PV à base de PEG/polyAANO-insuline. Cette préparation consiste à copolymériser les N-CarboxyAnhydrides d'AANO, en présence de N-méthylpyrrolidone, de méthanol et de PEG fonctionnalisé amine. On obtient du PEG/polyAANO, que l'on associe avec l'insuline. On précipite à l'aide d'eau de façon à obtenir les PV. Eventuellement, on neutralise, on dialyse, on concentre et on élimine l'eau. On produit ainsi un solide pulvérulent ou des PV en suspension chargé en insuline et on prépare des spécialités pharmaceutiques.

WO 02/28374 A1

**SUSPENSION COLLOÏDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE
VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS HYDROPHILES (INSULINE) ET LEUR
MODE DE PREPARATION**

5 Le domaine de la présente invention est celui des Particules de Vectorisation (PV), utiles pour l'administration de principes actifs (PA). Ces derniers sont, de préférence, des médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée,
10 intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc... En termes de nature chimique, les PA plus particulièrement concernés par l'invention sont hydrophiles, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, ou des
15 polynucléotides.

 La présente invention concerne, plus précisément, des suspensions colloïdales de Particules de Vectorisation, avantageusement de type submicronique, à base de blocs de polyaminoacides hydrophobes et polymères hydrophiles du type
20 polyalkylène-glycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG).

 La présente invention vise aussi, bien des particules nues (insuline) en tant que telles, que des systèmes de vecteurs de PA hydrophiles, constitués par des particules chargées par le (ou
25 les) PA.

 La présente invention a également trait à des solides pulvérulents comprenant ces PV.

 L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites suspensions colloïdales de particules, chargées en PA
30 hydrophile (insuline).

 L'encapsulation de PA dans les PV a notamment, pour but de modifier leur durée d'action et/ou de les acheminer au lieu du traitement et/ou augmenter la biodisponibilité desdits PA. De nombreuses techniques d'encapsulation ont déjà été proposées. De
35 telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport du PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse, digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du

PA sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autres, des molécules organiques d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M.J. HUMPHREY (Delivery system for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

Parmi tous les matériaux envisageables pour former des PV, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques. S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les PV, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 1 La première spécification recherchée pour les PV serait que le polymère, constituant les PV soit biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme. En outre, il conviendrait que la biodégradation dans l'organisme soit d'une durée suffisamment courte.
- 2 Les PV auraient avantage à pouvoir former, sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif, une suspension aqueuse stable.
- 3 Il serait également souhaitable que les PV aient une taille suffisamment faible pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante par un filtre dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2 μm .
- 4 Il est souhaitable que les PV et les systèmes PV-PA puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour le PA.
- 5 Les PV devraient, avantageusement, permettre de contrôler la vitesse de libération du PA.
- 6 Une autre spécification importante serait que les systèmes PV-PA puissent constituer d'excellents médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de

3

l'administration par injection -e.g. intraveineuse ou intramusculaire- « injectabilité » se caractérise par :

- (i) un volume injecté réduit (pour une dose thérapeutique donnée),
- (ii) une viscosité faible.

Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose thérapeutique de PA est associée à une quantité minimale de PV. En d'autres termes, les PV doivent avoir un fort taux de chargement en PA.

7 Le coût propre aux PV dans une préparation injectable doit être réduit et là encore il convient que les PV aient un fort taux de chargement en PA. En définitive, la faible taille et un fort taux de chargement sont des spécifications majeures recherchées pour les PV.

8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire.

9 Pour la famille de PA hydrophiles, en particulier les protéines et plus particulièrement encore l'insuline, il conviendrait d'avoir des PV qui soient adaptés à cette famille de PA en termes de facilité d'association et de libération et en termes de caractère non dénaturant.

Les propositions techniques antérieures, décrites infra, ont tenté de satisfaire l'ensemble de ces spécifications. A titre d'illustration, on citera les propositions antérieures (a) à (j) :

(a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine (chargée positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35 μ m.

(b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de PA. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles techniques d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être

dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.

- 5 (c) On connaît, également, des PV biocompatibles appelées protéinoïdes, décrites dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides, puis avec un changement de pH, ils provoquent la précipitation de particules protéinoïdes. Lorsque la précipitation s'effectue en présence d'un PA, celui-ci est encapsulé dans la particule.
- 10 15 (d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de PA propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopiques (160 μ m et de longueur égale à 2 000 μ m), constitués de copolymères de copoly(aminoacides) -e.g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine)- obtenus par copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA).
- 20 25 L'inclusion d'un PA s'opère par une technique d'évaporation de solvant d'un mélange de polymère et de PA. Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).
- 30 35 (e) La demande de brevet PCT/FR WO 97/02810 divulgue une composition pour la libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un PA absorbé sur lesdites particules. Dans ce cas, la libération du principe actif s'opère par désorption.

- (f) La publication « CHEMISTRY LETTERS 1995, 707, AKIYOSHI ET AL » concerne la stabilisation d'insuline par complexation supramoléculaire avec des polysaccharides hydrophobisés par greffage de cholestérol.
- 5 (g) L'article paru dans « MACROMOLECULES 1997, 30, 4013-4017 » décrit des copolymères composés d'un bloc polypeptide à base de L-phénylalanine, de (-benzyl-L-glutamate ou de O-(tétra-O-acétyl-D-glucopyranosyl)-L-sérine, et un bloc synthétique, tels que la poly(2-méthyl-2-oxazoline) ou la poly(2-phényl-2-oxazoline). Des polymères s'agrègent en milieu aqueux pour former des particules de 400 nm, capables de s'associer avec une enzyme, la lipase. La terme associée signifie ici que la protéine s'adsorbe sur la particule par un phénomène physique (pas de liaison covalente).
- 10 (h) La demande PCT WO 96/29991 a pour objet des particules de polyaminoacides utiles pour la vectorisation de PA dont notamment des PA hydrophiles tels que l'insuline. Ces particules ont une taille comprise entre 10 et 500 nm. Les particules selon le WO 96/29991 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent des monomères aminoacides neutres et hydrophobes AAO et des monomères ionisables et hydrophiles AAI. Ces particules peuvent être chargées en insuline, au mieux à hauteur de 6,5 % en poids sec d'insuline par rapport à la masse de PAA. Ta est mesuré selon un mode opératoire Ma décrit plus loin.
- 20 (i) L'EP 0 583 955 divulgue des micelles polymère capables de piéger physiquement des PA hydrophobes. Ces micelles sont constitués par des copolymères bloc : PEG/polyAANO (AANO = Amino-Acide Neutre hydrophObe).
- 25 L'AANO peut être : Leu, Val, Phe, Bz-O-Glu, Bz-O-Asp, ce dernier étant préféré. Les principes actifs PA hydrophobes piégés dans ces micelles PEG/polyAANO sont e.g.: adriamycine, indométhacine, daunomycine, methotrexate, mitomycine.
- 30 Dans cette demande de brevet, seuls sont exemplifiés les micelles à base de PEG/polyGlu-O-Bz. Or, il est à noter que ces esters Glu-O-Bz ne sont pas stables à l'hydrolyse en milieu aqueux. En outre, il n'est nullement question dans ce
- 35

document de particules constituées par un copolymère bloc PEG/polyAANO, dont le coeur est formé par le polyamino acide neutre hydrophobe et comprenant une chevelure externe hydrophile à base de PEG, ces particules étant aptes à s'associer avec des PA hydrophiles et à les libérer in vivo.

5 (j) On connaît également des nanoparticules de vectorisation sur lesquelles sont greffées des chaînes de PEG. Il s'agit par exemple de nanoparticules de polylactides ou de liposomes. Ce revêtement de chaînes de PEG est un moyen efficace connu de l'homme de l'art pour éviter l'adsorption de protéines (hydrophiles) sur ces nanoparticules recouvertes de PEG. De

10 telles nanoparticules ou liposomes sont qualifiés de "furtifs". La prévention de l'adsorption de protéines sur une surface par greffage de PEG, est décrite dans un très grand nombre d'articles par exemple : L. Illum et al. J. Pharm. Sci. 72, 1086, (1983). La description de liposomes "furtifs" ("stealth liposomes") peut être trouvée dans : [DD Lasic, FJ

15 Martin "Stealth Liposomes" CRC Press (BocaRaton, FL) 1995; MC Woodle, DD Lasic "Sterically Stabilized Liposomes" Biochim Biophys Acta 1992, 1113, 171-199; MC Woodle "Controlling Liposome Blood Clearance by surface grafted polymers" Advanced Drug Delivery Reviews 1998, 32, 139-152].

20 On trouvera également une synthèse de ces questions dans : ["Polyéthylène-glycol coated biodegradable nanospheres R.Gref et al in "microparticulated for the delivery of proteins and vaccines" S. Cohen et al Ed. Marcel Dekker 1996"]. Comme le chargement en principe actif de ces nanoparticules furtives est empêché, ces auteurs préconisent une encapsulation à cœur des principes actifs par un procédé en voie solvant organique.

25 Or, ce type de procédé est contraire aux spécifications 2 & 4 du cahier des charges ci-dessus défini.

30

Il ressort donc de ce qui précède que les propositions techniques antérieures sus décrites, et notamment la proposition

35 (i), satisfont incomplètement aux spécifications du cahier des charges indiqué supra, et, en particulier pour ce qui concerne l'association des particules à des principes actifs hydrophiles (protéines telles que l'insuline) ainsi que l'aptitude de ces

particules chargées en PA hydrophiles à libérer ces derniers in vivo sans qu'ils n'aient été altérés par la vectorisation.

5 Dans cet état de fait, l'un des objectifs essentiels est de pouvoir fournir de nouvelles PV qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs ou de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables de PV et adaptées à la vectorisation de PA hydrophiles (notamment des protéines telles que l'insuline). Il s'agit d'obtenir des suspensions de particules chargées en
10 principe actif hydrophile, de préférence en protéines telles que l'insuline.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir de nouvelles PV en suspension aqueuse colloïdale stable (notamment à l'hydrolyse) ou sous forme pulvérulente et à base de
15 poly(aminoacides) (PAA), ces nouvelles PV se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 9 du cahier des charges susvisé.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de perfectionner les particules divulguées dans la demande EP 0 583 955.

20 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de PV dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de chargement en PA et en termes de contrôle de cinétique de libération du PA.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir
25 des suspensions médicamenteuses hydrophiles injectables. Les spécifications, requises pour de telles suspensions, sont un faible volume d'injection et une faible viscosité. Il importe que la masse de particules colloïdales par dose d'injection soit le plus faible possible et ce sans limiter la quantité du principe
30 actif PA transporté par ces particules, afin de ne pas nuire à l'efficacité thérapeutique.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs
35 satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale comprenant des particules de vectorisation de principes actifs filtrables sur des filtres de 0,2 μm à des fins de stérilisation.

5 Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de PAA utiles, notamment, comme vecteurs de principes actifs hydrophiles (notamment protéines telles que l'insuline), ledit procédé se devant d'être, plus simple à mettre
10 en œuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules en suspension aqueuse ou sous forme solide
15 pour la préparation de médicaments (e.g. vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intra-musculaire, intradermique, intra-péritonéale, intracérébrale ou parentérale, les principes actifs hydrophiles de ces médicaments pouvant être, notamment, des
20 protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament, du type système à libération prolongée de principes
25 actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

Les objectifs relatifs aux produits (parmi d'autres) sont
30 atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale de particules submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés :

- 35 • à base d'un copolymère amphiphile comprenant :
- ✓ au moins un bloc de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), hydrophobe(s) à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAO

constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;

✓ et au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;

5 • aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;

caractérisée en ce que les particules qu'elle contient sont

10 associées et/ou peuvent être associées avec au moins un PA sélectionné parmi les PA hydrophiles, de préférence parmi les protéines, ce PA étant plus préférentiellement encore constitué par de l'insuline.

L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules de

15 vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un copolymère bloc polymère hydrophile/polyaminoacide hydrophobe permettant d'obtenir des particules de taille submicronique, qui forment une suspension colloïdale aqueuse stable en l'absence de

20 tensioactifs ou de solvants et qui soient adaptés à des PA hydrophiles.

Il est particulièrement surprenant et inattendu que les particules à base de copolymère bloc polymère hydrophile polyalkylèneglycol/polyaminoacide hydrophobe connues pour piéger

25 des principes actifs hydrophobes (EP 0 583 955), puissent s'associer et libérer in vivo des PA hydrophiles, en particulier des protéines telles que l'insuline.

En outre, l'homme du métier connaissant l'utilisation d'une couche extérieure de PEG pour prévenir l'adsorption des protéines

30 hydrophiles, aurait tout naturellement écarté cette solution pour la conception de nanoparticules devant au contraire adsorber une grande quantité de protéines hydrophiles. Contre toute attente, il n'en est rien dans le cadre de l'invention.

La structure des copolymères bloc PAG/Poly AAO et la nature

35 des acides aminés AAO, sont choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules (PV) de petite taille,

- les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique,
- les PV s'associent avec des protéines ou autres PA hydrophiles en milieu aqueux, par un mécanisme spontané et non dénaturant pour la protéine,
- les PV libèrent les PA hydrophiles en milieu physiologique et, plus précisément, in vivo ; la cinétique de libération est fonction de la nature du copolymère PAG/Poly AAO précurseur des PV.

10 Ainsi, en jouant sur la structure particulière du copolymère, on peut contrôler les phénomènes d'association et de libération du PA sur le plan cinétique et quantitatif.

De préférence, le PAG correspond à du Polyéthylène-Glycol (PEG) ou à du polypropylène-glycol (PPG), le PEG étant
15 particulièrement préféré.

Suivant une autre caractéristique de l'invention, le PAG -de préférence le PEG- possède une masse molaire en poids comprise entre 500 et 50000 D, de préférence entre 1000 et 10000 D, et plus préférentiellement encore entre 1000 et 5000 D.

20 Avantageusement, la suspension selon l'invention est caractérisée par un taux de chargement Ta des particules de vectorisation avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse et mesuré selon un mode opératoire Ma, Ta étant tel que :

25 $7 \leq Ta$
de préférence, $8 \leq Ta \leq 50$
et, plus préférentiellement encore, $10 \leq Ta \leq 30$.

Mode opératoire Ma :

30 (a) Préparation d'une solution aqueuse d'insuline : De l'insuline recombinante humaine lyophilisée (Sigma n° 10259) est versée dans une solution HCl 0,1 N durant 5 min à 25°C. Cette solution est ensuite versée dans une solution de tampon phosphate qui est finalement neutralisée par ajout de
35 NaOH de 0,1 N. La solution est laissée ensuite au repos 30 min à température ambiante, puis filtrée sur membrane "acrodisc" 0,8-0,2 µm. La masse d'insuline est calculée en

fonction du volume souhaité de solution, afin d'obtenir une concentration de 60 UI/ml.

- (b) Dispersion des particules de vectorisation en PAA à associer dans la solution d'insuline : Les PV lyophilisées sont ajoutées à la solution d'insuline, à raison de 10 mg PV/ml de solution. Ce mélange est agité au vortex à deux ou trois reprises, puis placé dans un agitateur à basculement à température ambiante pendant 18 heures. La suspension colloïdale est ensuite conservée à 4°C.
- (c) Séparation de l'insuline libre de l'insuline associée et dosage de l'insuline libre : La solution, contenant l'insuline et les PV, est centrifugée 1 heure sous 60 000 g à 20°C. Le surnageant est disposé dans des tubes munis d'une membrane d'ultrafiltration (seuil de coupure 100 000Da) et centrifugé sous 3 000 g 2 heures à 20°C. L'insuline dans le filtrat est dosée par CLHP.

Pour définir un peu plus les copolymères constitutifs des particules, on peut indiquer qu'ils sont du type séquentiel alterné (blocs).

Ainsi, selon une forme préférée de réalisation de la suspension de PV selon l'invention :

- les AAO sont des acides aminés neutres hydrophobes AANO,
- le rapport PAG/AANO est > 1 ,
- et la longueur absolue du bloc PEG est > 2 monomères, de préférence > 10 monomères, et plus préférentiellement > 20 monomères.

Avantageusement, le ou les blocs PAA à base d'AANO en comprennent au moins 5, de préférence au moins 10, et plus préférentiellement encore au moins entre 10 et 50.

De manière plus préférée encore, les particules sont des "diblocs" de PEG/AANO.

Ces aminoacides neutres hydrophiles (AANO) sont en pratique sont choisis dans le groupe comprenant:

- des acides aminés neutres naturels : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe, leurs mélanges,
- des acides aminés neutres, rares ou synthétiques : norleucine, norvaline,

- des dérivés des acides aminés polaires: Glutamate de méthyl, glutamate de éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine.

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, les PAA
5 blocs constitutifs des particules ont des degrés de polymérisation DP compris entre 30 et 600, de préférence entre 50 et 200 et, plus préférentiellement encore, entre 60 et 150.

La présente invention vise, non seulement des suspensions de
particules nues, telles que définies ci-dessus, mais également des
10 particules comprenant au moins un principe actif PA. De préférence, la suspension selon l'invention est aqueuse et stable. Ces particules, chargées ou non en PA, sont, avantageusement, sous forme dispersée dans un liquide (suspension), de préférence aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide
15 pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de PV telle que définie ci-dessus.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne, outre une suspension colloïdale (de préférence aqueuse) de PV, un solide pulvérulent comprenant des PV et obtenu à partir de la suspension
20 selon l'invention.

Un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la préparation des particules sélectionnées (telles que décrites ci-avant), aussi bien sous forme de suspension colloïdale que sous forme de solide pulvérulent. Le procédé de préparation considéré
25 consiste, essentiellement, à synthétiser des copolymères PAG/polyAAO précurseur et à les transformer en particules structurées.

Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation du solide pulvérulent susvisé et formé par de
30 particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s), ces particules étant des arrangements supramoléculaires discrets :

- à base d'un copolymère amphiphile comprenant :
35 ✓ au moins un bloc de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), hydrophobe(s) à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAO

13

constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;

✓ et au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;

- aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardé.

10 Ce procédé est caractérisé en ce que :

- 1) on fait réagir au moins un segment PAG avec au moins un segment PAA comprenant chacun au moins un monomère alkylène-glycol ou aminoacide respectivement et au moins une fonction réactive permettant de former une ou des liaisons PAA-PAG (de préférence amide), de façon à obtenir un copolymère bloc PAG-polyAAO ;
- 2) on précipite -de préférence dans l'eau-, le copolymère bloc PAG-polyAAO obtenu à l'étape 1, ce qui conduit à la formation spontanée de particules de vectorisation de PA ;
- 3) on associe au moins un principe actif PA hydrophile avec les particules ;
- 4) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;
- 5) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 4 ;
- 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.

Les fonctions des segments PAG et PAA de l'étape 1 peuvent être des fonctions amine ou acide carboxylique. On peut envisager de réaliser la polymérisation conduisant au bloc PAG et/ouPAA avant, pendant ou après la formation de la liaison PAG-PAA.

Toutes ces variantes sont à la portée de l'homme de l'art.
De préférence, dans l'étape 1 :

1.1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'acides hydrophobes AAO en présence :

- 5 - d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfoxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférée ;
- 10 - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant particulièrement préféré ;

15 1.2) on met en œuvre ou on prépare par polymérisation de monomères alkylène-glycol (de préférence éthylène ou propylène-glycol) au moins un bloc polymère PAG de poly-alkylène-glycol (de préférence de PEG ou PPG) ; ce bloc PAG étant fonctionnalisé (avantageusement à au moins l'une de ses extrémités) par au moins un groupement réactif nucléophile, de préférence choisi dans le groupe comprenant les amines (en particulier les amines primaires ou secondaires), les alcools ou les thiols ;

20 1.3) on ajoute le PAG fonctionnalisé de l'étape 2 au milieu de polymérisation du bloc de poly-AAO, avant, pendant ou après la polymérisation.

L'étape 1.1 du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-(α -aminoacides (NCA),
30 décrites, par exemple, dans l'article « Biopolymers, 15, 1869 (1976) » et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF « α -Aminoacid-N-carboxy Anhydride and Related Heterocycles » Springer Verlag (1987).

Suivant une variante, à l'issue de l'étape 1.1, on précipite
35 -de préférence dans l'eau- le copolymère poly(AAO) (pAAI) obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le copolymère poly(AAO) (pAAI) sous forme de précipité formant un

produit intermédiaire stable. Ce précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.

De manière plus préférée encore, les NCA-pAAI sont des NCA d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé, par exemple des NCA-
5 Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle - Et = éthyle).

De préférence, le ou les bloc(s) PAG fonctionnalisés est
(sont) introduit(s) avant et/ou au début de la polymérisation, qui
se déroule de préférence à une température comprise entre 20 et
10 120°C à pression atmosphérique normale.

Avantageusement, les PAG de l'étape 1.2 sont des produits commerciaux disponibles (PEG e.g.), ou bien encore sont obtenus de manière connue en soi par polymérisation d'oxyde d'éthylène

D'autres paramètres, comme la concentration en polymère, la
15 température du mélange réactionnel, le mode d'ajout du polymère hydrophile, l'emploi de pression réduite, la durée de la réaction, etc... sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.

Pour effectuer l'association (étape 3) d'un ou plusieurs PA
20 aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention. Des exemples, non limitatifs, de ces méthodes sont énumérés ci-après.

Selon une première méthode, on effectue l'association de PA
aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse
25 ou non) contenant le PA avec la suspension colloïdale de particules.

Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du PA
aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules. Le PA solide peut être,
30 par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (PAA), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase liquide (aqueuse
35 ou non) contenant le PA.

Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec le PA sous forme solide. On

disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

Dans toutes ces méthodes, le PA utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

- 5 Conformément à l'étape facultative 5, on élimine les impuretés (sels) ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse) (étape 4), filtration, modification pH, chromatographie...

- 10 Cela conduit à une suspension aqueuse de particules structurées qui peut être concentrée, par exemple par distillation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation.

- 15 Pour concentrer (étape 6) ou pour séparer (étape 7) les particules de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par exemple par distillation par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation. On récupère, à l'issue de cette étape 7, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

- 20 Il est à noter que la mise en œuvre des étapes 1, 2, 3, 4 et éventuellement 5 du procédé ci-dessus correspondant à une préparation d'une suspension colloïdale de particules submicroniques et à fort taux de chargement avec les PA hydrophiles.

- 25 Lors de cette préparation de suspension colloïdale, les copolymères amphiphiles PAG-poly(AAO) de l'étape 1 sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des PAG est soluble et au moins une partie des AANO est insoluble. Les copolymères PAG/polyAANO existent sous forme de nanoparticules
30 dans ce milieu aqueux.

Une alternative pour préparer la suspension de PV selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus en tant que produit et par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, non solvant des AANO.

- 35 Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à

l'invention, contrôler la taille des particules et atteindre des valeurs de Dh entre 25 et 100 nm, est un atout important.

La présente invention vise, également, de nouveaux produits
5 intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAG-polyAAO précurseurs de particules.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent, tels que définis ci-dessus
10 et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif hydrophile, choisi, de préférence, parmi :

- les vaccins ;
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus
15 préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants
20 de l'hématopoïèse ;
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- 25 • des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes ;
- et leurs mélanges.

30 Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en PA hydrophile et tels que définis ci-dessus.

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également,
35 l'utilisation de ces PV (en suspension ou sous forme solide) chargées en PA, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de PA.

Il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

5 Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un PA associé aux PV selon l'invention et applicables par voie transdermique.

10 Les exemples qui suivent et qui concernent le PA hydrophile formé par l'insuline permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en insuline, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

15

LEGENDES DES FIGURES

Fig 1 - Evolution de la glycémie G : [...—o...—] (moyenne en % basal) et de l'insulinémie moyenne I (en mUI/l) : [...—] après injection d'une formulation de PV chargée en insuline à raison de 20 0,5 UI/kg, en fonction du temps T (en heures).

EXEMPLES

Exemple 1 -

25 Préparation du polymère-poly(leucine)-bloc-polyéthylèneglycol

Les techniques utilisées, pour la polymérisation des NCA en polymères de structures en blocs ou statistiques sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. 30 KRICHELDORF "α-aminoacides-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles", Springer Verlag (1987). La synthèse suivante précise la synthèse de l'un d'entre eux.

35 Synthèse de la poly(Ala)₄₀-PEG: 10 g de NCA-Leu sont solubilisés dans 150 ml de NMP à 60°C. 5 ml d'une solution de 2 g de aminoethyl-PEG (Mw = 5000 D) dans 50 ml de NMP sont ajoutés au monomère en une fois. Après 2 h, on verse le milieu réactionnel

dans 1 l d'eau. Le précipitat formé est filtré, lavé et séché.
Rendement > 95%.

Exemple 2 -

5 Préparation du polymère-poly(phénylalanine)-bloc-polyéthylèneglycol

Synthèse de la poly(Leu)₄₀-PEG: 10 g de NCA-Phe sont solubilisés dans 150 ml de NMP à 60°C. 5 ml d'une solution de 2 g de aminoethyl-PEG (Mw = 5000 D) dans 50 ml de N-méthylpyrrolidone
10 (NMP) sont ajoutés au monomère en une fois. Après 2 h, on vers le milieu réactionnel dans 1 l d'eau. Le précipitat formé est filtré, lavé et séché. Rendement > 95%.

Exemple 3 -

15 Mise en évidence des nanoparticules par Diffusion de la Lumière (DDL) et par Microscopie Electronique à Transmission (TEM)

10 mg de particules du polymère 1 sont suspendus dans 10 ml d'eau ou une solution aqueuse de sel. Cette solution est ensuite
20 introduite dans un granulomètre Coulter (ou diffractomètre laser). Les résultats de l'analyse de la granulométrie des différents produits testés sont présentés dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 - Mesures de la taille des PV

Exemple	Polymère	Taille (nm)
1	POLY(LEU) ₄₀ -PEG	100
2	POLY(PHE) ₄₀ -PEG	100

25

Exemple 4 -

Test d'association des nanoparticules avec une protéine (l'insuline)

30 A partir d'une solution tampon phosphate isotonique de pH 7,4, on prépare une solution d'insuline humaine titrée à 1,4 mg/ml correspondant à 40 UI/ml. Dans 1 ml de cette solution d'insuline, on disperse 10 mg du PV préparé dans l'exemple 1. Après 15 heures d'incubation à température ambiante, l'insuline associée aux PV et

l'insuline libre sont séparées par centrifugation (60 000 g, 1 heure) et ultrafiltration (seuil de filtration 300 000 D). L'insuline libre récupérée dans le filtrat est dosée par CLHP ou par ELISA et l'on en déduit par différence la quantité d'insuline associée. La quantité d'insuline associée au PV est supérieure à 0,77 mg, ce qui représente plus de 55 % du total de l'insuline engagée.

Le tableau suivant rassemble les résultats des mesures de taux d'association effectuées sur différents PV. Le taux d'association exprime le pourcentage d'insuline associée par rapport à l'insuline engagée dans une préparation titrée à 1.4 mg/ml d'insuline et 10 mg/ml de PV. Cette valeur est transformée en un taux de chargement qui exprime une formulation à 100% de fixation de la protéine, en mg d'insuline par 100 mg de PV.

Tableau 2 - Mesures du taux d'association avec l'insuline pour un mélange 0.14 mg INSULINE/mg PV

Exemple	Polymère	Taux de chargement mg/100mg PV
1	POLY(LEU) ₄₀ -PEG	13.6
2	POLY(PHE) ₄₀ -PEG	>15

20 Exemple 5 -

Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-chargés avec l'insuline chez le chien sain à jeun

Le protocole de cet exemple est le suivant :

25 La préparation de l'exemple 4 a été injectée à des chiens, rendus diabétiques par pancréatectomie totale, et à jeun de la veille au soir. L'administration à 11 heures du matin par voie sous cutanée thoracique de la préparation a été faite à la posologie de 0,5 UI/kg d'insuline par Kg de poids vif de l'animal. Le volume administré est compris entre 0,18 et 0,24 ml. Au temps -4, -2, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 et 48 heures, 1 ml de sang sont prélevés par ponction jugulaire sous vide sur tube héparinate de sodium. 30 µl de sang total sont utilisés extemporanément pour mesure de la glycémie. Le tube est ensuite

centrifugé, décanté et le plasma stocké à -20°C pour dosage de l'insuline. Les résultats présentés dans la figure 1 ci-après montrent un relargage de l'insuline jusqu'à 12 heures (trait plein) et un effet hypoglycémiant important qui se prolonge jusqu'à 20 heures (trait discontinu) après l'injection.

Tableau 3 - Mesures du temps d'action de l'insuline (effet hypoglycémiant) en présence de PV selon l'invention

Exemple	Polymère	Temps de retour au niveau basal (h)
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1
1	POLY(LEU) ₄₀ -PEG	20H
2	POLY(PHE) ₄₀ -PEG	>20H

10

Cet exemple démontre la non dénaturation de l'insuline en présence de PV selon l'invention.

Il met également en évidence l'augmentation de la durée d'action de l'insuline par rapport à l'insuline non formulée, et donc, l'utilité des PV comme système à libération contrôlée de l'insuline.

15

REVENDICATIONS

1- Suspension colloïdale de particules submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des arrangements
5 supramoléculaires individualisés :

- à base d'un copolymère amphiphile comprenant :
 - ✓ au moins un bloc de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), hydrophobe(s) à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAO constitutifs de ce bloc PAA
10 étant identiques ou différents entre eux ;
 - ✓ et au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;
 - aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non
15 dissous, avec au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- caractérisée en ce que les particules qu'elle contient sont associées et/ou peuvent être associées avec au moins un PA sélectionné parmi les PA hydrophiles, de préférence parmi les
20 protéines, ce PA étant plus préférentiellement encore constitué par de l'insuline.

2- Suspension selon la revendication 1, caractérisée par un taux de chargement Ta des particules de vectorisation avec
25 l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse et mesuré selon un mode opératoire Ma, Ta étant tel que :

$$7 \leq Ta$$

de préférence, $8 \leq Ta \leq 50$
30 et, plus préférentiellement encore, $10 \leq Ta \leq 30$.

3- Suspension selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le PAG -de préférence le PEG- possède une masse molaire en poids comprise entre 500 et 50000 D, de préférence entre 1000 et
35 10000 D, et plus préférentiellement encore entre 1000 et 5000 D.

4- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée :

- en ce que les AAO sont des acides aminés neutres hydrophobes AANO,
- en ce que le rapport PAG/AANO est > 1 ,
- et en ce que la longueur absolue du bloc PEG est > 2 monomères, de préférence > 10 monomères, et plus préférentiellement > 20 monomères.

5- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le ou les blocs PAA à base d'AANO en comprennent au moins 5, de préférence au moins 10, et plus préférentiellement encore au moins entre 10 et 50.

6- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les particules sont des « diblocs » PEG/AANO.

7- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les AANO sont choisis dans le groupe comprenant:

- des acides aminés neutres naturels : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe, leurs mélanges ;
- des acides aminés neutres, rares ou synthétiques : norleucine, norvaline ;
- des dérivés des acides aminés polaires: Glutamate de méthyl, glutamate de éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine.

8- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.

9- Solide pulvérulent, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10- Procédé de préparation du solide pulvérulent selon la revendication 9, caractérisée en ce que :

- 5 1) on fait réagir au moins un segment PAG avec au moins un segment PAA comprenant chacun au moins un monomère alkylène-glycol ou aminoacide respectivement et au moins une fonction réactive permettant de former une ou des liaisons PAA-PAG (de préférence amide), de façon à obtenir un copolymère bloc PAG-polyAAO ;
- 10 2) on précipite - de préférence dans l'eau -, le copolymère bloc PAG-polyAAO obtenu à l'étape 1, ce qui conduit à la formation spontanée de particules de vectorisation de PA ;
- 3) on associe au moins un principe actif PA hydrophile avec les particules ;
- 15 4) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;
- 5) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 4 ;
- 20 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.

11- Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que dans l'étape 1 :

- 25 1.1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'amino-acides hydrophobes AAO en présence :
 - 30 - d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfoxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférée ;
 - 35 - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la

pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools,
le méthanol étant particulièrement préféré ;

- 5 1.2) on met en œuvre ou on prépare par polymérisation de monomères alkylène-glycol (de préférence éthylène ou propylène-glycol) au moins un bloc polymère PAG de poly-alkylène-glycol (de préférence de PEG ou PPG) ; ce bloc PAG étant fonctionnalisé (avantageusement à au moins l'une de ses extrémités) par au moins un groupement réactif nucléophile, de préférence choisi
10 dans le groupe comprenant les amines (en particulier les amines primaires ou secondaires), les alcools ou les thiols ;
- 1.3) on ajoute le PAG fonctionnalisé de l'étape 2 au milieu de polymérisation du bloc de poly-AAO, avant, pendant
15 ou après la polymérisation.

12- Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que, le ou les bloc(s) PAG fonctionnalisé(s) est (sont) introduit(s) avant et/ou au début de la polymérisation, qui se
20 déroule de préférence à une température comprise entre 20 et 120°C à pression atmosphérique normale.

13- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on
25 met en présence d'un milieu aqueux non solvant des AAO, le solide pulvérulent selon la revendication 9 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 10.

14- Procédé de préparation de la suspension selon l'une
30 quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 1,2,3,4 et éventuellement 5 du procédé selon la revendication 10.

15- Procédé de préparation de la suspension selon l'une
35 quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA hydrophile aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant ledit PA hydrophile avec la suspension colloïdale de particules.

16- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA hydrophile aux particules par mise en présence dudit PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.

17- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 9 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 10, avec une phase liquide contenant le PA hydrophile.

18- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 9 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 10, avec le PA hydrophile sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

19- Produits intermédiaires du procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAG-polyAAO, de préférence PEG-polyAANO, précurseurs de particules.

20- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 18 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 9 comprenant un moins un principe actif hydrophile choisi, de préférence, parmi :

- o les vaccins ;
- o les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de

27

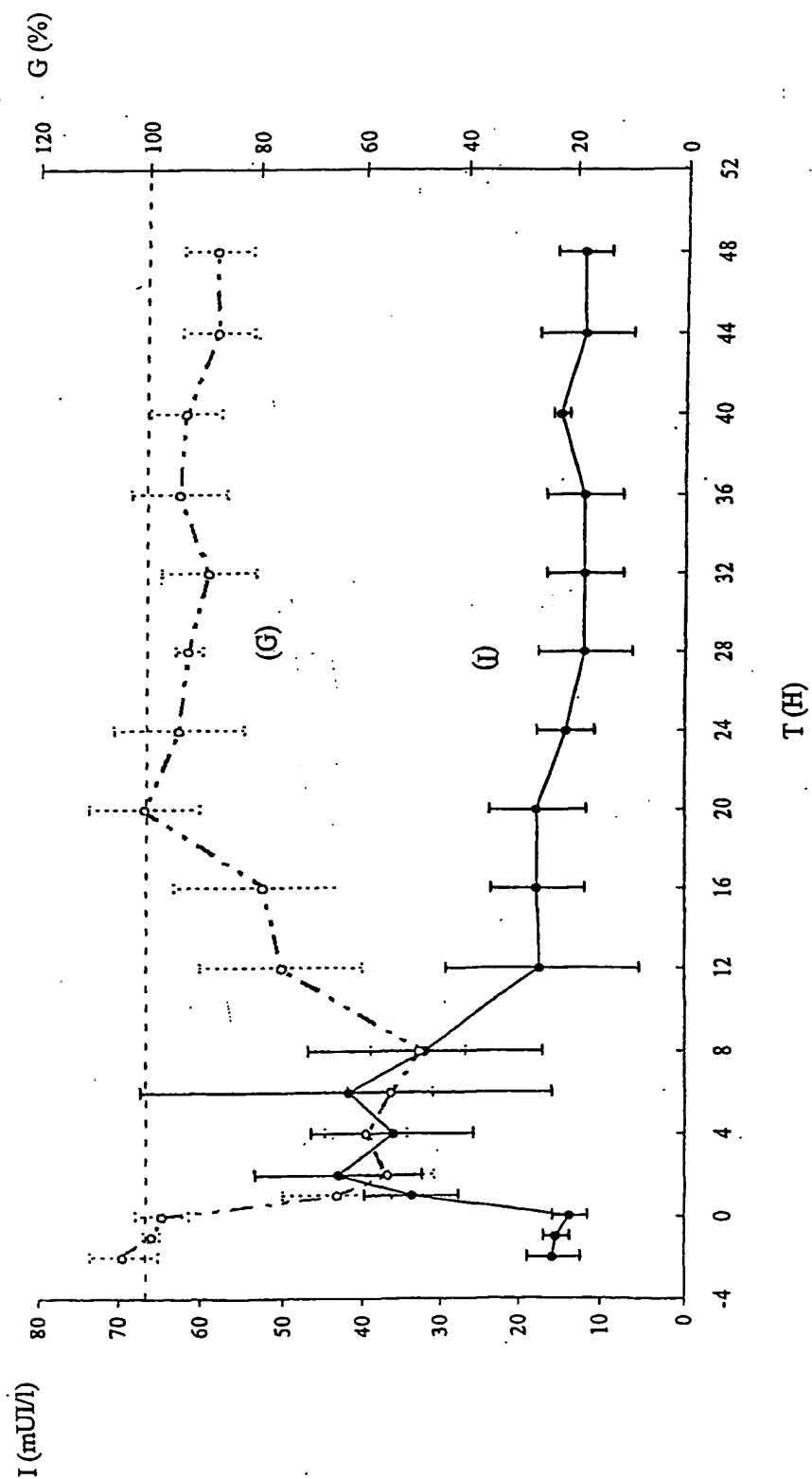
croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;

- 5 o les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- o les acides nucléiques et, préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- 10 o des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes ;
- o et leurs mélanges.

- 21- Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle,
- 15 phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 18 et/ou du solide pulvérulent selon la revendication 9.

20

1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/FR 01/03028A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/51 B01J13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 583 955 A (JAPAN RES DEV CORP) 23 February 1994 (1994-02-23) page 2, line 1 - page 3, line 43 claims 1-5 --- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2001

Date of mailing of the international search report

29/11/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat

Application No

PCT/FR 01/03028

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARADA A ET AL: "FORMATION OF POLYION COMPLEX MICELLES IN AN AQUEOUS MILIEU FROM A PAIR OF OPPOSITELY-CHARGED BLOCK COLOPYMERS WITH POLY(ETHYLENE GLYCOL) SEGMENTS" MACROMOLECULES,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, vol. 28, no. 15, 17 July 1995 (1995-07-17), pages 5294-5299, XP000566344 ISSN: 0024-9297 abstract page 5294, column 1, line 1 -column 2, line 3 page 5298, column 2, line 40 -page 5299, column 1, line 9	1-21
A	EP 0 721 776 A (JAPAN RES DEV CORP) 17 July 1996 (1996-07-17) page 3, line 14 - line 28 claims 1-7	1-21
A	KAZUNORI KATAOKA: "PREPARATION OF NOVEL DRUG CARRIER BASED ON THE SELF-ASSOCIATION OF BLOCK COPOLYMER" DRUG DELIVERY SYSTEM,XX,XX, vol. 10, no. 5, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 363-370, XP000566774 ISSN: 0913-5006 abstract	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern.

Application No

PCT/FR 01/03028

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0583955	A	23-02-1994	JP 2777530 B2	16-07-1998
			JP 6107565 A	19-04-1994
			AU 668967 B2	23-05-1996
			AU 4452393 A	10-03-1994
			CA 2104045 A1	15-02-1994
			DE 69327490 D1	10-02-2000
			EP 0583955 A2	23-02-1994
			ES 2141135 T3	16-03-2000
			KR 9609407 B1	19-07-1996
			US 5449513 A	12-09-1995
			US 5510103 A	23-04-1996
EP 0721776	A	17-07-1996	JP 2690276 B2	10-12-1997
			JP 8188541 A	23-07-1996
			AU 4090096 A	18-07-1996
			CA 2166931 A1	11-07-1996
			EP 0721776 A1	17-07-1996
			US 2001000510 A1	26-04-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/03028

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K9/51 B01J13/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 583 955 A (JAPAN RES DEV CORP) 23 février 1994 (1994-02-23) page 2, ligne 1 -page 3, ligne 43 revendications 1-5 --- -/--	1-21

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/11/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Muller, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demant ernationale No
PCT/FR 01/03028

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>HARADA A ET AL: "FORMATION OF POLYION COMPLEX MICELLES IN AN AQUEOUS MILIEU FROM A PAIR OF OPPOSITELY-CHARGED BLOCK COLOPYMERS WITH POLY(ETHYLENE GLYCOL) SEGMENTS"</p> <p>MACROMOLECULES, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, vol. 28, no. 15, 17 juillet 1995 (1995-07-17), pages 5294-5299, XP000566344 ISSN: 0024-9297</p> <p>abrégé page 5294, colonne 1, ligne 1 -colonne 2, ligne 3 page 5298, colonne 2, ligne 40 -page 5299, colonne 1, ligne 9</p>	1-21
A	<p>EP 0 721 776 A (JAPAN RES DEV CORP) 17 juillet 1996 (1996-07-17) page 3, ligne 14 - ligne 28 revendications 1-7</p>	1-21
A	<p>KAZUNORI KATAOKA: "PREPARATION OF NOVEL DRUG CARRIER BASED ON THE SELF-ASSOCIATION OF BLOCK COPOLYMER"</p> <p>DRUG DELIVERY SYSTEM, XX, XX, vol. 10, no. 5, 1 septembre 1995 (1995-09-01), pages 363-370, XP000566774 ISSN: 0913-5006</p> <p>abrégé</p>	1-21

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande

Internationale No

PCT/FR 01/03028

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0583955	A	23-02-1994	JP 2777530 B2	16-07-1998
			JP 6107565 A	19-04-1994
			AU 668967 B2	23-05-1996
			AU 4452393 A	10-03-1994
			CA 2104045 A1	15-02-1994
			DE 69327490 D1	10-02-2000
			EP 0583955 A2	23-02-1994
			ES 2141135 T3	16-03-2000
			KR 9609407 B1	19-07-1996
			US 5449513 A	12-09-1995
			US 5510103 A	23-04-1996
EP 0721776	A	17-07-1996	JP 2690276 B2	10-12-1997
			JP 8188541 A	23-07-1996
			AU 4090096 A	18-07-1996
			CA 2166931 A1	11-07-1996
			EP 0721776 A1	17-07-1996
			US 2001000510 A1	26-04-2001

THIS PAGE BLANK (USPTO)